



**PCRFast<sup>®</sup>**  
**Listeria monocytogenes**

**Realtime (Sonde)**  
**Realtime (probe)**

**IF/MR1002**

Deutsch ..... Seite 2  
English ..... Page 13

## Kurzinformation

Einfach durchzuführender molekularbiologischer Test (PCR) zum Nachweis von *Listeria monocytogenes* in Realtime (Fam Sonde mit nicht fluoreszierendem Quencher) in Lebensmitteln und Futtermitteln (Nachweis des *prfA* Gens). Mit dem Test können 96 Reaktionen durchgeführt werden. Alle Reaktionsgefäße enthalten ein spezifisches Primerpaar, die Sonde und eine interne Amplifikationskontrolle (HEX Sonde mit nicht fluoreszierenden Quencher) zur Überprüfung möglicher inhibitorischer Effekte.

8 Reaktionsgefäße (rote Markierung) enthalten zusätzlich *Listeria monocytogenes* - DNA für die Positivkontrolle (PTC).

Zeitbedarf:	Anreicherung.....ca. 24 h
(10 Proben)	DNA - Extraktion.....45 min
	PCR-Ansatz.....15 min
	PCR.....1,5 h

### **PCRFast®**

ist ein eingetragenes Warenzeichen der ifp Institut für Produktqualität GmbH.  
ifp führt auch Auftragsanalytik durch.

Hersteller: ifp Institut für Produktqualität GmbH  
Teltowkanalstr. 2, 12247 Berlin, Germany  
[www.produktqualitaet.com](http://www.produktqualitaet.com)

### **PCRFast®**

is a registered trademark of the ifp Institut für Produktqualität GmbH.  
ifp also offers contract analysis.

Manufacturer: ifp Institut für Produktqualität GmbH  
Teltowkanalstr. 2, 12247 Berlin, Germany  
[www.produktqualitaet.com](http://www.produktqualitaet.com)

## 1. Testprinzip

PCRFast® *Listeria monocytogenes* ist ein einfach durchzuführender molekular-biologischer Test (PCR) zum Nachweis von *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln und Futtermitteln (Nachweis des *prfA* Gens). Der Vorschlag zur Durchführung entspricht den internationalen Standards (ISO) für die PCR Analytik sowie den offiziellen Vorschriften nach § 64 LFGB.

**Alle Reaktionsgefäße** enthalten die für die PCR - Reaktion notwendigen spezifischen Primer und die Sonde in optimaler Menge und eine **interne Amplifikationskontrolle (ITC)** zur Überprüfung möglicher inhibitorischer Effekte.

Die **nicht markierten Reaktionsgefäße (farblos)** werden für den Nachweis von ***Listeria monocytogenes* - DNA in der extrahierten Probe** verwendet sowie für die **Negativkontrollen NTC** (Überprüfung des MasterMixes auf Kontamination) und für die **Extraktionskontrolle ETC** (Überprüfung der Extraktion auf Kontamination).

Die **markierten Reaktionsgefäße (rot)** enthalten neben den Primern und der Sonde zusätzlich *Listeria monocytogenes* - DNA. Diese werden für die **Positivkontrollen PTC** (Überprüfung der Funktionalität des MasterMixes) verwendet.

In das Reaktionsgefäß wird **12,5 µl zweifach konzentrierter MasterMix** vorgelegt und anschließend **12,5 µl des DNA - Extraktes** zugegeben. Der MasterMix enthält bereits Polymerase, Nukleotide und Magnesiumchlorid in optimaler Konzentration. Die Zielsequenz wird dann in einem PCR - Thermocycler amplifiziert. Bei korrekter Amplikonsequenz hybridisiert die Sonde auf den vervielfältigten DNA-Abschnitten. Dabei werden Reporter (Fam/HEX) und Quencher (nicht fluoreszierend) der Sonde getrennt und der Reporter (Fam/HEX) sendet ein Fluoreszenzsignal (Fam: 520 nm, HEX: 553 nm) aus. Die Intensität dieses Signals steigt mit der Menge an neu gebildeter DNA an, wodurch sich bei vorhandener Zielsequenz ein Anstieg der Fluoreszenz messen und darstellen läßt. Bei nicht vorhandener Zielsequenz ist kein Fluoreszenzanstieg beobachtbar.

## 2. Packungsinhalt

Der Testkit enthält:

- 11 x **Streifen (farblos)** mit je 8 x 0,2 ml Reaktionsgefäßen (88 Reaktionsgefäße), beschichtet mit spezifischen Primern und Sonde (für die Probenbestimmungen, Negativkontrollen NTC und Extraktionskontrollen ETC) und einer internen Amplifikationskontrolle.
- 1 x **Streifen (rot)** mit je 8 x 0,2 ml Reaktionsgefäßen (8 Reaktionsgefäße), beschichtet mit spezifischen Primern, Sonde und *Listeria monocytogenes* - DNA (für die Positivkontrollen PTC) und einer internen Amplifikationskontrolle.

## 3. Zusätzlich benötigte Reagenzien und Geräte

### Geräte und Labormaterialien

- Homogenisierer (Stomacher)
- Stomacher - Beutel, steril
- Messzylinder, steril
- Erlenmeyerkolben, steril
- Kulturröhrchen, steril
- Brutschrank 30 °C
- Vortexer
- Biozentrifuge, mind. 14.000 x g (für 1,5 ml und 2,0 ml Reaktionsgefäße)
- **PCR – Thermocycler Realtime:**
  - z.B. Applied Biosystems 7500, STRATAGENE Mx 3005 P, Mx 3000 P
- Mikroliterpipetten 2 - 20 µl; 20 - 200 µl; 100 - 1000 µl, z. B. Gilson Pipetman P, jeweils mit Filterspitzen
- 1,5 ml oder 2,0 ml Reaktionsgefäße

### Reagenzien

#### Anreicherung

- Selektive *Listeria* Anreicherungsbouillon bestehend aus
  - Listeria - Anreicherungsbouillon (Basis) nach FDA / IDF - FIL (MERCK)
  - + Listeria - Selektiv - Anreicherungssupplement nach FDA - BAM 1995 / IDF - FIL (MERCK)

#### DNA-Extraktion

- Ethanol >95 % (vergällt)
- 0,1 x TE - Puffer (TRIS 1 mmol / l, EDTA 0,1 mmol / l)
- Wasser deionisiert, DNA – frei
- DNA-Extraktionskit, z.B. PCRFast<sup>®</sup> Microbe Extraction

PCRFast<sup>®</sup> *Listeria monocytogenes* Realtime (Sonde / probe) 08-11-12

## **PCR**

### **Realtime**

zweifach konzentrierter MasterMix (Hotstart empfohlen),  
z. B. AmpliTaq Gold® PCR MasterMix, Applied Biosystems Nr. 4318739;  
Brilliant® II QPCR MasterMix, Stratagene Nr. 600804; QuantiTect Probe  
PCR Kit, Qiagen Nr. 204343

## **4. Vorsichtsmaßnahmen**

- alle Arbeiten sollten mit den im Labor üblichen Schutzmassnahmen und alle PCR Arbeiten entsprechend den Empfehlungen nach CEN / ISO durchgeführt werden
- zur Vermeidung von Verschleppungen alle Arbeiten mit Schutzhandschuhen und Filterspitzen durchführen
- räumliche Trennung von Probenaufarbeitung, PCR - Setup und Detektion beachten

## **5. Reagenzien und ihre Lagerung**

Den Testkit bzw. die Reaktionsgefäße bei 2 - 8 °C lagern.

## **6. Probenanreicherung und DNA - Isolierung**

### **6.1. Anreicherung**

Die Anreicherung von Lebensmittelproben erfolgt nach den Vorschriften des Bacteriological Analytical Manual (BAM) der U. S. Food and Drug Administration (FDA). Die selektive Listeria - Anreicherungsbouillon mit der Listeria - Anreicherungsbouillon (Basis) und dem Listeria - Selektiv - Anreicherungs supplement gemäß den Herstellerangaben herstellen.

25 g (ml) einer Lebensmittelprobe werden in einen sterilen Stomacher - Beutel eingewogen, 1 : 10 (w / v) mit selektiver Listeria - Anreicherungsbouillon verdünnt und 48 h bei 30 °C bebrütet (z. B. 25 g Probe + 225 ml selektive Listeria Anreicherungsbouillon).

Bei jeder Analysenserie sollte ein Ansatz ohne Matrixzugabe als Extraktionskontrolle mitgeführt werden. Eine positive Extraktionskontrolle zeigt eine Kontamination der Reagenzien an.

## 6.2. DNA - Isolierung

Für die DNA - Extraktion wird 1 ml aus 6.1. entnommen und entsprechend aufgearbeitet (Extraktionsprotokoll siehe **PCRFast<sup>®</sup> Microbe Extraction**). Vor dem ersten Extraktionsschritt ist es notwendig eine Lysozymbehandlung durchzuführen. Nach der DNA - Extraktion wird das Eluat 1 : 10 mit 0,1 x TE - Puffer verdünnt.

## 6.3. Bestätigung verdächtiger Kolonien

Zur Bestätigung verdächtiger Kolonien auf festen Nährmedien ist es ausreichend, wenn eine Öse dieser Kolonie in 0,2 ml Wasser deionisiert aufgeschlämmt und 10 min bei 95 °C erhitzt wird. Anschließend wird die Probe abgekühlt und 5 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Der Überstand kann dann direkt für PCRFast<sup>®</sup> verwendet werden.

## 7. PCR - Ansatz

### 7.1. Vorbereitungen

- Streifen aus der Folie entnehmen und benötigte Anzahl Reaktionsgefäße abtrennen
- die restlichen Streifen / Reaktionsgefäße zusammen mit dem Trockenbeutel in die Folie zurücklegen, Folie gut verschließen und bei 2 - 8 °C lagern
- die benötigte Menge MasterMix bereitstellen (pro Reaktion 12,5 µl)

## 7.2. Ansatz

–folgende Volumina in die Reaktionsgefäße pipettieren:

Pro Probe	Reaktionsgefäß	Master-Mix	Probe
<b>Probe</b>	farblos	12,5 µl	12,5 µl
Pro Ansatz	Reaktionsgefäß	Master-Mix	0,1 x TE - Puffer
<b>Negativ-kontrolle NTC</b>	farblos	12,5 µl	12,5 µl
<b>Positiv-kontrolle PTC</b>	rot	12,5 µl	12,5 µl

Tab. 1: Pipettieransatz PCRFast<sup>®</sup> Listeria monocytogenes

–die Reaktionsgefäße verschließen (abzentrifugieren empfohlen) und in den PCR - Thermocycler stellen.

## 7.3. Geräteeinstellungen

Reporter: Fam und HEX  
Quencher: keine Fluoreszenz  
Referenzfarbstoff: ROX (abhängig vom verwendeten MasterMix)

Für die Amplifikation folgendes Temperatur - / Cyclerprofil einstellen:

### Cyclerprofil

10 min	95 °C	
15 sec	95 °C	
30 sec	50 °C	<b>45 Zyklen</b>
30 sec	72 °C	

### Anmerkung:

Die Validierung wurde mit TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix von Applied Biosystems und Brilliant<sup>®</sup> II QPCR MasterMix von Stratagene und den unter Punkt 3 genannten Thermocyclern durchgeführt. Eventuell muss das vorgegebene Cyclerprofil an das jeweilige Gerät und den MasterMix angepasst werden.

## 7.5. Detektion

- die Auswertung der Amplifikation erfolgt über den Amplificationplot
- prinzipiell soll die Auswertung über die Software der Realtime Thermocycler erfolgen. Ergeben die Voreinstellungen der Analysesoftware keine zufriedenstellenden Ergebnisse, lassen sich die Einstellungen für den „Threshold“ und die „Basislinie“ ändern

## 8. Auswertung

In der folgenden Tabelle ist die Auswertung zusammengefasst. Bei einer positiven Probe liegt der Fluoreszenzendwert der Amplifikationskurve deutlich über dem Threshold.

### 8.1. Auswertematrix

<b>Probe</b>	<b>Inhibitions- kontrolle ITC</b>	<b>Negativ- kontrolle NTC</b>	<b>Positiv- kontrolle PTC</b>	<b>Ergebnis</b>
<b>+</b>	<b>+</b>			Probe positiv
keine Amplifikation	<b>+</b>			Probe negativ
keine Amplifikation	keine Amplifikation			Inhibition*
		keine Amplifikation		MasterMix nicht kont.
			<b>+</b>	MasterMix funktionsf.

\* extrahierte Proben - DNA nochmals verdünnen und erneut amplifizieren

+ = Amplifikationssignal

Tab. 2: Auswertung PCRFast® *Listeria monocytogenes*

## 8.2. Beispiele für die Auswertung der Amplifikationplots

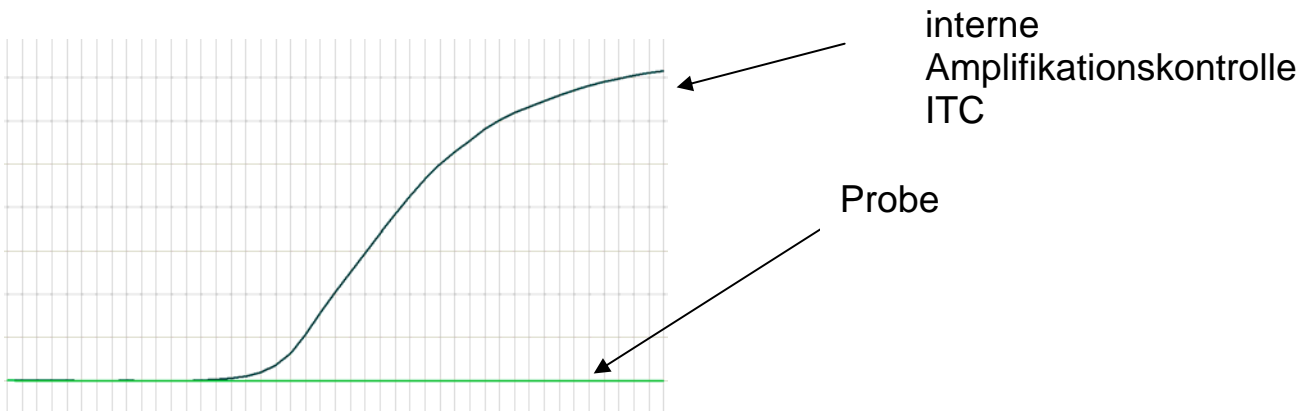


Abb. 2: Probe ist negativ (keine Amplifizierung der Probe)

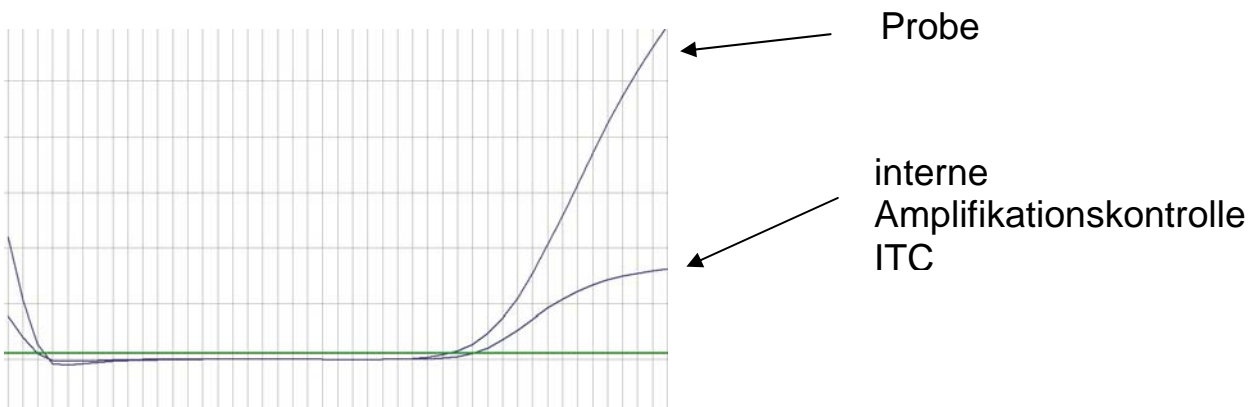


Abb. 3: Probe ist positiv

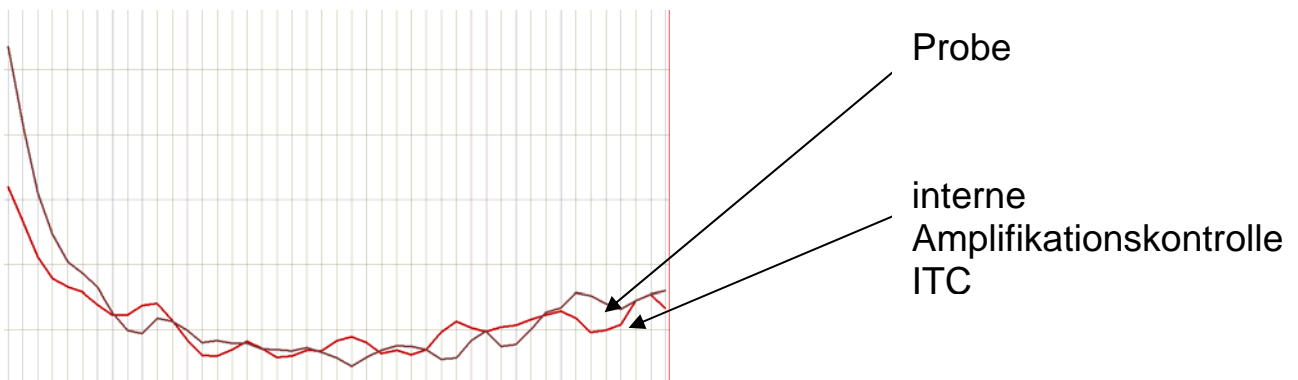


Abb. 4: Inhibition der Reaktion, isolierte DNA nochmals verdünnen und erneut amplifizieren

## 9. Sensitivität

Nachweisgrenze: 1 *Listeria monocytogenes* in 25 g Probenmaterial.

## 10. Spezifität

PCRFast<sup>®</sup> *Listeria monocytogenes* ist 100 % spezifisch. Folgende Spezies wurden mit jeweils mindestens 2500 Kopien auf Kreuzreaktivität getestet:

Spezies		Spezies		Spezies	
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	Salmonellen	-	<i>Campylobacter jejuni</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	-	<i>Enterobacter sakazakii</i>	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Legionella erythra</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
VTEC stx1	-	VTEC stx2	-		

Tab. 4: Spezifität PCRFast<sup>®</sup> *Listeria monocytogenes*

- + Amplifikation
- keine Amplifikation

Sollten Fragen zur Durchführung des Testes, zur Probenaufarbeitung oder zur PCR - Analytik im Allgemeinen bestehen, dann wenden Sie sich bitte an das Kompetenzzentrum für DNA - Analytik des ifp, Institut für Produktqualität.

info@produktqualitaet.com  
Tel. 0049 (0) 30 76 68 60 - 0  
Fax 0049 (0) 30 76 68 60 - 50



Weitere Informationen zur Durchführung von PCRFast<sup>®</sup> finden Sie auch unter [www.produktqualitaet.com](http://www.produktqualitaet.com).

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. ifp übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung der Produkte entstehen nicht.

## 11. Literatur

### **Hitchins, A.D.**

„Detection and Enumeration of *Listeria Monocytogenes* in Foods“  
U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual Online  
January 2003, Chapter 10

### **Rossmannith, P. Krassnig, M. Wagner, M. Hein, I.**

Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment /  
real - time PCR method targeting the *prfA* gene  
*Research in Microbiology* 157 (2006) 763 - 771

### **Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (entspricht ISO 22174)**

L 00.00 - 45 „Allgemeine verfahrensspezifische Anforderungen zum  
Nachweis von Mikroorganismen mit der Polymerase - Kettenreaktion (PCR)  
in Lebensmitteln“

### **Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (entspricht ISO 20837)**

L 00.00 - 109 „Anforderungen an die Probenvorbereitung für den qualitativen  
Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln mit der  
Polymerase - Kettenreaktion (PCR)“

### **Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (entspricht ISO 20838)**

L 00.00 - 110 „Anforderung an die Amplifikation und den Nachweis bei  
qualitativen Verfahren zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in  
Lebensmitteln mit der Polymerase – Kettenreaktion (PCR)“

# PCRFast<sup>®</sup> *Listeria monocytogenes* Realtime (Probe)

## Brief information

Simple, molecular biological test (PCR) for detecting *Listeria monocytogenes* in realtime (probe with Fam reporter and non fluorescence quencher) in foodstuffs and animal feed (detection of the prfA gene). The test kit has 96 reaction vials, each reaction vial contains a specific primer pair the probe and an internal amplification control (probe with a HEX reporter and non fluorescence quencher) for investigating possible inhibiting effects (ITC).

8 reaction vials (red marking) contain additionally *Listeria monocytogenes* DNA for PCR positive controls (PTC).

Time required:	enrichment.....	approx. 24 h
	extraction.....	45 min
(10 samples)	PCR setup.....	15 min
	PCR.....	1.5 h

PCRFast<sup>®</sup>  
ist ein eingetragenes Warenzeichen der ifp Institut für Produktqualität GmbH.  
ifp führt auch Auftragsanalytik durch.

Hersteller: ifp Institut für Produktqualität GmbH  
Teltowkanalstr. 2, 12247 Berlin, Germany  
[www.produktqualitaet.com](http://www.produktqualitaet.com)

PCRFast<sup>®</sup>  
is a registered trademark of ifp Institut für Produktqualität GmbH.  
ifp also offers contract analyses.

Manufacturer: ifp Institut für Produktqualität GmbH  
Teltowkanalstr. 2, 12247 Berlin, Germany  
[www.produktqualitaet.com](http://www.produktqualitaet.com)

## 1. Principle of the test

PCRFast<sup>®</sup> *Listeria monocytogenes* is a simple, molecular biological test (PCR) for detecting *Listeria monocytogenes* in foodstuff and animal feed (detection of the *invA* gene). The analytical procedure described here complies with the international standards (ISO) for PCR analysis and the § 64 of the German Foodstuffs and Animal Feed Code (LFGB).

**All the reaction vials** contain the for the PCR reaction necessary specific primers and probe in an optimum amount and an **internal amplification control ITC** for investigating inhibitory effects.

The **colourless reaction vials** are used for the detection of the **specific DNA** extracted from the sample, for the **negative controls NTC** (checking the MasterMix for contamination) and for the **extraction control ETC** (check on extraction for contamination).

In addition to the primers, **the red – coloured reaction vials** contain ***Listeria monocytogenes* DNA**. These reaction vials are used for the **positive control PTC** (check on functionality of MasterMix).

**12.5 µl of double concentrated MasterMix** and, subsequently, **12.5 µl of the extracted DNA sample** is added into the reaction vial. The MasterMix contains an optimum concentration of polymerase, nucleotides and magnesium chloride. The target sequence is then amplified in a PCR thermocycler. Is the target present the probe hybridises on the built up DNA fragments. Thereby the reporter (Fam/HEX) and the quencher (non fluorescence) of the probe will be seperated and the reporter radiates a fluorescence signal (Fam: 520 nm, HEX: 553 nm). The intensity of the signal increases with the amount of synthesised DNA which could be measured and displayed. If the target sequence is not present no increase in the fluorecence is detectable.

## 2. Package contents

The test kit contains:

- 11 x **strips (colourless)** with eight 0.2 ml reaction vials each (88 reaction vials), coated with specific primers, probe (for sample determinations and for the negative controls NTC) and an internal amplification control.
- 1 x **strips (red)** with eight 0.2 ml reaction vials each (8 reaction vials), coated with specific primers, probe and additionally *Listeria monocytogenes* DNA (for the positive controls PTC) and an internal amplification control.

## 3. Additionally required instruments and reagents

### Lab material and instruments

- homogenizer (Stomacher)
- stomacher bag, sterile
- measuring cylinder, sterile
- erlenmeyer flask, sterile
- culture tube, sterile
- 30 °C (86 °F) incubator
- vortexer
- biocentrifuge, min. 14,000 x g (for 1.5 ml and 2.0 ml reaction vials)
- **PCR thermocycler:**
  - e.g. Applied Biosystems 7500, STRATAGENE Mx 3005 P, Mx 3000 P
- microliter pipettes 2 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1,000 µl, e.g. Gilson Pipetman P with filter tips
- 1.5 ml or 2.0 ml reaction vials

### Reagents

#### Enrichment

- pre - enrichment: peptone water, buffered
- selective enrichment: Rappaport - Vassiliadis (RVS)

#### DNA extraction

- ethanol >95 % (denatured)
- 0.1 x TE - buffer (TRIS 1 mmol / l, EDTA 0.1 mmol / l)
- water deionised, DNA free
- DNA-extraction kit, e.g. PCRFast<sup>®</sup> Microbe Extraction

## **PCR**

### **Realtime**

double concentrated MasterMix (Hotstart recommended),  
e.g. AmpliTaq Gold<sup>®</sup> PCR MasterMix, Applied Biosystems No. 4318739;  
Brilliant<sup>®</sup> II QPCR MasterMix, Stratagene No. 600804; QuantiTect Probe  
PCR Kit, Qiagen No. 204343

## **4. Precautions**

- all tasks should be performed taking all precautions common in labs, and all PCR tasks should be performed in accordance with the CEN / ISO recommendations
- to avoid carryovers, perform all work wearing protective gloves and use filter tips
- perform sample preparation, PCR setup and detection in separate rooms

## **5. Storage instructions**

Store the test kit and the reaction vials at 2 - 8 °C (35.6 - 46.4 °F).

## **6. Sample enrichment and DNA isolation**

### **6.1. Enrichment**

Foodstuff samples are enriched according to Bacteriological Analytical Manual (BAM) of U. S. Food and Drugs Administration (FDA).

The Selective - Listeria - Enrichment - Broth with Listeria - Enrichment - Broth (Basis) and Listeria - Selective Enrichment Supplement will be prepared according to the manufacturer manual.

25 g (ml) of a foodstuff sample is weighed in a sterile stomacher bag, diluted at a ratio of 1 : 10 (w / v) with Selective - Listeria - Enrichment - Broth and incubated at 30 °C (86 °F) for 48 h (e.g. 25 g sample + 225 ml selective Listeria - Enrichment - Broth).

With each analyzing series one sample without matrix should be done as an extraction control. A positive extraction control indicates a contamination in the reagents.

### **6.2. DNA isolation**

For DNA extraction, take 1 ml from 6.1. and prepare the DNA accordingly the PCRFast<sup>®</sup> Microbe Extraction protocol (it is important to make a

preincubation with a lytic enzyme, before beginning with the extraction step 1; after the extraction the eluate has to be diluted with a ratio of 1 : 10 with 0.1 x TE buffer).

### 6.3. Confirming suspect colonies

To confirm suspect colonies on solid culture medium, it suffices to slurry one loop of this colony in 0.2 ml of deionized water and heat it at 95 °C (203 °F) for 10 min. The sample is then cooled and centrifuged at 14,000 x g for 5 min. The supernatant can be used directly for PCRFast®.

## 7. PCR setup

### 7.1. Preparations

- remove strip from the plastic bag and separate required number of reaction vials
- place the remaining strips / reaction vials and the desiccant back into the bag, seal bag and store at 2 - 8 °C (35.6 - 46.4 °F)
- have the required amount of MasterMix at hand (12.5 µl per reaction)

### 7.2. Procedure

- pipette the following volumes into the reaction vials:

per sample	<b>reaction vial</b>	<b>MasterMix</b>	<b>DNA from sample</b>
<b>sample</b>	colourless	12.5 µl	12.5 µl
per analysis run	<b>reaction vial</b>	<b>Master-Mix</b>	<b>0.1 x TE buffer</b>
<b>negative control NTC</b>	colourless	12,5 µl	12.5 µl
<b>positive control PTC</b>	red	12.5 µl	12.5 µl

Tab. 1: PCRFast® *Listeria monocytogenes* pipetting steps

- close the reaction vials (centrifuging recommended) and place them into the PCR thermocycler.

### 7.3. Instrument settings

Reporter: Fam and HEX  
Quencher: non fluorescence  
Reference dye: ROX (depending on used master mix)

Perform amplification according to the following temperature / cycler profile:

#### **Cycler profile**

10 min	95 °C (203 °F)	
15 sec	95 °C (203 °F)	
30 sec	50 °C (122 °F)	<b>35 cycles</b>
30 sec	72 °C (161.6 °F)	

#### **Note:**

Validation was performed using TaqMan® Universal PCR Master Mix by Applied Biosystems and Brilliant® II QPCR MasterMix by Stratagene and the thermocyclers specified in section 3. The specified cycler profile may need to be adjusted to the respective instrument and the MasterMix.

### 7.4. Detection

- assessment of the amplification in realtime is done via the amplification plot
- in principle the evaluation should be done using the software of the realtime thermocycler. Are the results not satisfactory using the instrument presettings, the threshold and the baseline settings could be changed

## 8. Evaluation

The following table summarizes the evaluation. With a positive sample the final point of the fluorescence curve lies clearly above the threshold

### 8.1. Evaluation matrix

<b>Sample</b>	<b>Inhibition control (ITC)</b>	<b>Negative control NTC</b>	<b>Positive control PTC</b>	<b>Result</b>
+	+			sample positive
no amplification	+			sample negative
no amplification	no amplification			inhibition*
		no amplification		MasterMix not contaminated
			+	MasterMix functional

\* dilute extracted sample DNA once more and amplify again

Tab. 3: Evaluation of PCRFast® *Listeria monocytogenes*

## 8.2. Examples of amplification plot evaluation

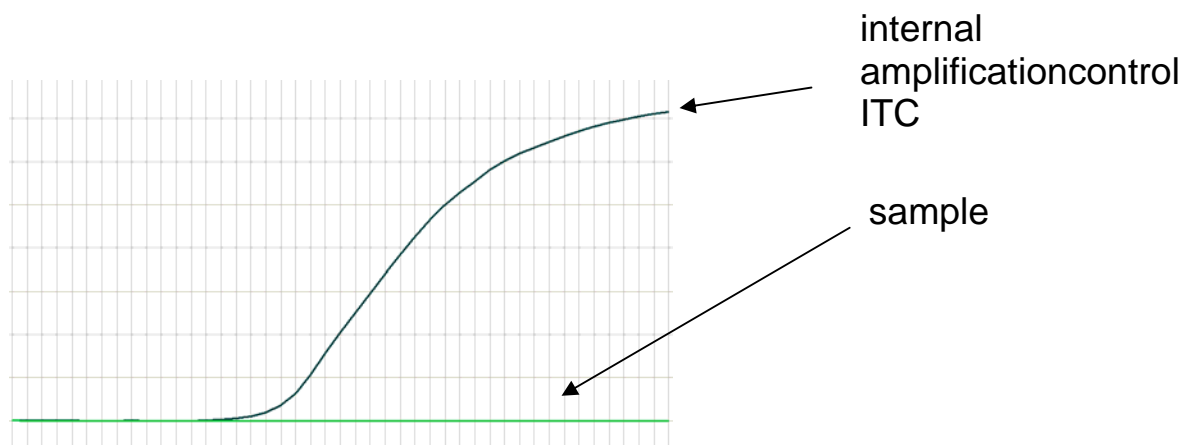


Fig. 1: sample negative; sample without amplification plot

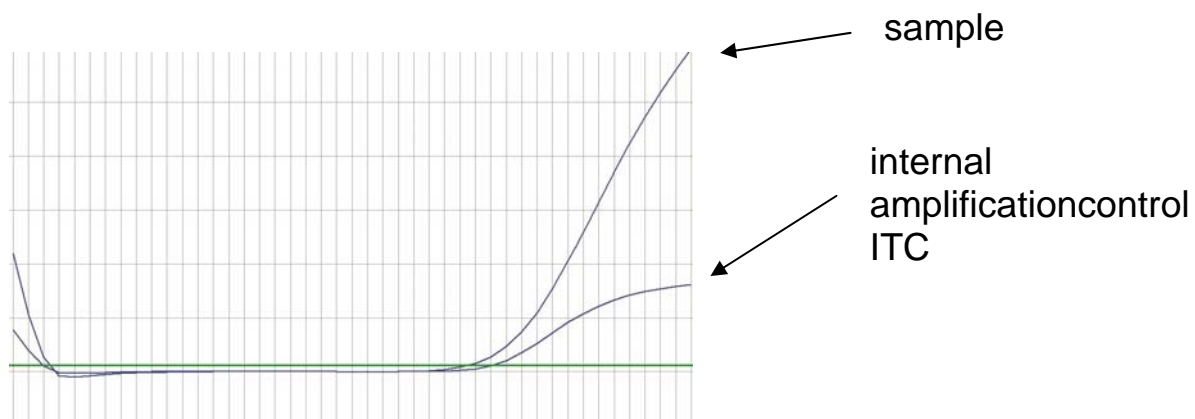


Fig. 2: sample positive

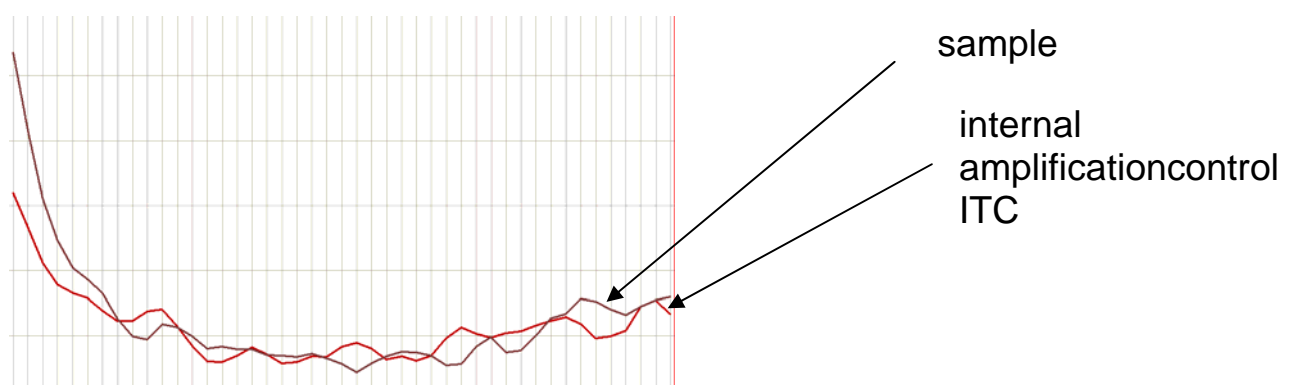


Fig. 3: reaction inhibition, further diluting the isolated DNA

## 9. Sensitivity

Limit of detection: 1 *Listeria monocytogenes* in 25 g sample.

## 10. Specificity

PCRFast<sup>®</sup> *Listeria monocytogenes* is 100% specific. The following species have each been tested for cross-reactivity with at least 2500 copies:

Species		Species		Species	
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	<i>Salmonella</i>	-	<i>Campylobacter jejuni</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	-	<i>Enterobacter sakazakii</i>	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Legionella erythra</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
VTEC stx1	-	VTEC stx2	-		

Tab. 4: Specificity of PCRFast<sup>®</sup> *Listeria monocytogenes*

+ amplification

+ no amplification

Should you have any questions on how to conduct this test, on sample preparations or on PCR analysis in general, please contact the Competence Centre for DNA Analysis of ifp, Institut für Produktqualität.

info@produktqualitaet.com

Tel. 0049 (0) 30 76 68 60 - 0

Fax 0049 (0) 30 76 68 60 - 50



You will also find more information on conducting PCRFast<sup>®</sup> at [www.produktqualitaet.com](http://www.produktqualitaet.com).

These specifications are based on our current state of knowledge and are designed to provide information about our products and their potential applications. They are not intended to guarantee certain product properties or suitability for a specific application. ifp does not accept any liability except for the standard quality of the reagents. Replacement will be provided for any defective products. ifp is not liable for any other claims concerning direct or indirect damage or costs arising from the use of the products.

## 11. References

### **Hitchins, A.D.**

„Detection and Enumeration of *Listeria Monocytogenes* in Foods“  
U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual Online  
January 2003, Chapter 10

### **Rossmannith, P. Krassnig, M. Wagner, M. Hein, I.**

Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment /  
real - time PCR method targeting the *prfA* gene  
*Research in Microbiology* 157 (2006) 763 - 771

### **ISO 22174**

Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction  
(PCR) for the detection of food - borne pathogens - General requirements  
and definitions

### **ISO 20837**

Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction  
(PCR) for the detection of food - borne pathogens - Requirements for sample  
preparation and qualitative detection

### **ISO 20838**

Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction  
(PCR) for the detection of food - borne pathogens - Requirements for  
amplification and detection for qualitative methods